



関西学院大学リポジトリ

Kwansei Gakuin University Repository

# 転写因子E2Fによるがん化抑制機構の解析

著者	尾田 衡弥
発行年	2018
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10236/00027982">http://hdl.handle.net/10236/00027982</a>

## 転写因子 E2F によるがん化抑制機構の解析

関西学院大学大学院理工学研究科  
生命科学専攻 大谷研究室 尾田 衡弥

【研究目的】 転写因子 E2F は、増殖刺激に応じて増殖関連遺伝子を活性化し、細胞増殖を促進する一方で、がん性変化が生じると、アポトーシス関連のがん抑制遺伝子を活性化し、アポトーシスを通じてがん化抑制に働く。このように E2F は、細胞増殖とがん化抑制という相反する作用をもつ標的遺伝子を制御している。E2F の標的遺伝子発現には、活性化型 E2F (E2F1~E2F3a)が重要である。E2F1 はアポトーシス関連遺伝子の活性化能が最も高く、E2F3a はほとんど活性化しない。E2F1 と E2F3a の間で N 末端領域の相同性が他の領域と比べて低いことから、N 末端領域の違いが標的遺伝子発現の制御に関与している可能性が考えられる。本研究は、この可能性を明らかにすることを 1 つの目的とする。また、増殖刺激とがん性変化による E2F 標的遺伝子発現の仕分けは、間葉系細胞である線維芽細胞を用いて明らかにされた。この概念が 9 割以上のがんが由来する上皮系細胞にも当てはまるのかを明らかにすることをもう 1 つの目的とする。

【実験方法】 E2F1 と E2F3a の野生型、N 末端領域欠失変異体、N 末端領域交換変異体の標的遺伝子に対する転写活性化能は、レポーターアッセイと qRT-PCR で調べた。それぞれの N 末端領域単体での転写活性化能は Mammalian one-hybrid 法で調べた。変異体 E2F の局およびタンパク質発現量は、免疫蛍光染色とウェスタンブロットングで調べた。上皮系細胞における E2F による標的遺伝子発現の制御は、不死化ヒト正常網膜色素上皮細胞 RPE1 を用いて、レポーターアッセイと qRT-PCR で調べた。

【実験結果と考察】 E2F1 と E2F3a の N 末端領域欠失変異体および交換変異体を用い、それぞれの N 末端領域がアポトーシス関連遺伝子の発現に与える影響をレポーターアッセイと qRT-PCR で調べた。E2F1 の N 末端領域を欠失すると活性化能が減弱し、E2F3a の N 末端領域を E2F1 の N 末端領域に入れ替えると E2F3a の活性化能が増強した。逆に、E2F3a の N 末端領域を欠失すると活性化能が増強し、E2F1 の N 末端領域を E2F3a の N 末端領域に入れ替えると E2F1 の活性化能が減弱した。このことから、E2F1 の N 末端領域には標的遺伝子を活性化する作用が、E2F3a の N 末端領域には活性化を阻害する作用があると考えられた。E2F1 の N 末端領域に相互作用する因子が、転写活性化に貢献する可能性が考えられた。そこで、E2F1 の新規相互作用因子 DDX5 に関してレポーターアッセイで調べたところ、DDX5 は E2F1 の N 末端領域依存的に活性化を増強した。また、E2F1 の N 末端領域に転写活性化能があるのかを、GAL4 DNA 結合領域との融合タンパク質として発現させ、GAL4 結合配列をもつレポーターを用いて調べた。E2F1 の N 末端領域単体で転写活性化能が見られことから、E2F1 の N 末端領域に転写活性化領域があることが示唆された。N 末端領域の欠失や交換で認められた作用が細胞内局在やタンパク質発現量の変化によるものではないことを確認するために、免疫蛍光染色とウェスタンブロットングで調べた。いずれの変異体も核に局在していたため、局在の変化によるものではなかった。しかし、タンパク質の発現量に違いが見られた。そこでシクロヘキシミドを用いてタンパク質安定性を調べたところ、E2F1 の N 末端領域には安定化作用が、E2F3a の N 末端領域には不安定化作用があることが示唆された。それぞれの N 末端領域の標的遺伝子の活性化およびその阻害作用の 1 つは、タンパク質安定性の増減によることが示唆された。また、不死化ヒト正常網膜色素上皮細胞 RPE1 細胞においても、増殖関連遺伝子は増殖刺激とがん性変化の両者に反応し、がん抑制遺伝子はがん性変化を模倣する E2F1 の過剰発現および RB の強制的不活性化にのみ反応した。このことから、上皮系細胞においても E2F による仕分け機構が機能していると考えられた。